

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（総括 分担）研究報告書

テトロドトキシンのリスク管理に関する研究

研究代表者又は研究分担者

渡邊 龍一 中央水産研究所 主任研究員
内田 肇 中央水産研究所 任期付研究員
松嶋 良次 中央水産研究所 主任研究員
及川 寛 中央水産研究所 グループ長
鈴木 敏之 中央水産研究所 センター長

研究要旨：マウスに対するテトロドトキシシン（TTX）の腹腔内投与毒性や急性経口毒性を明らかにするために必要な TTX 標準毒の正確な値付け手法の開発と分析用標準毒の調製、フグやフグ糠漬けに含まれる TTX とその類縁体含量を測定できる迅速な LC/MS/MS 法を開発した。まず、TTX 標準毒の正確な値付け手法の開発では、非破壊分析法であり、かつ SI トレサブルな定量法である NMR 装置を用いて、プロトンシグナルが水素核数に比例するような、外部標準を用いた定量測定条件を設定した。TTX のスペクトル上で良く分離した H4a 位のシグナルを見つけ、値付けに用いた。また、TTX は最大 4 成分（TTX 10,7-lactone 体、TTX hemilactal 体、4,9-anhydroTTX、4-*ep*TTX）の混合溶液となるため、この混合溶液を調製し、定量に用いることのできるシグナル（TTX hemilactal 体を除く）を見出した。動物試験に使用する TTX 試薬を購入したところ、カプリル酸が約 30%含まれていたため、これを除去し、濃度を NMR にて決定した動物試験用 TTX 溶液を国立医薬品食品衛生研究所に引き渡した。値付けに用いた溶液の一部を使い、酢酸溶液で希釈した LC/MS/MS 用分析標準品を調製した。また、TTX の溶液安定性（4）を一年近くにわたって調べたところ、比較的安定であった。また、東北大学から TTX 類縁体（約 10 成分）を含んだコモング活性炭抽出液を恵与いただき、超高速液体クロマトグラフィーを用いた LC/MS/MS 法を開発した。これにより次年度実施するフグ糠漬け内の TTX 分析が可能となった。また、この分析法を用いて、TTX 混合溶液の 4,9-anhydroTTX と 4-*ep*TTX の相対モル感度を求めたところ、それぞれ 0.46 と 0.73 であった。これにより、標準品のない類縁体の定量が可能となった。

A. 研究目的

フグの安全性確保については、現行のフグに関わる規制の遵守により食中毒の発生を防止している。加えて、フグ卵巣の糠漬けなどについては 10MU/g の規制値を設けてリスク管理がなされている。しかし、基準値についての科学的な妥当性については十分に検証されていないのが実情である。

そこで、マウスに対する腹腔内投与毒性や急性経口毒性を明らかにすることを目的とし、テトロドトキシン (TTX) 標準毒の正確な値付け手法の開発と分析用標準毒の調製、フグやフグ糠漬けに含まれる TTX とその類縁体含量を測定できる迅速な LC/MS/MS 法を開発する。

B. 研究方法

製造元が異なる 4 社から TTX 酢酸塩 1mg を 2 本と TTX クエン酸塩 1mg を各 2 本の計 4 本を購入した。それぞれを 1ml の 4% 重酢酸/重水溶液に溶解し、そのうちの 0.6ml を NMR による定量に使用し、残りの約 0.4ml を希釈して LC/MS/MS 分析に供した。なお、NMR を用いた定量では、39.05 mM のマレイン酸(4% 重酢酸/重水溶液に溶解)を外標準とし、PULCON 法で定量したが、2次元 NMR スペクトルを測定し、定量には他シグナルとよく分離しているものを選択した。この方法を用いて、各試薬の TTX と TTX 類縁体含量を求めた。分析には、Bruker 社製の AVANCE III 800 (^1H : 800 MHz)を用いた。また、安定性の検討では NMR チューブに入れた TTX 溶液を 4 にて一年近く保存し、定期的に TTX の含量を求めた。

購入した 4 社の製品のうち、最も純度の

高いものを選び、毒性評価用とした。毒性評価用とした試薬の一部について NMR にて純度を調べたところ、カプリル酸が 30%近く混入していることが判明した。そこで、グラファイトカーボン固相抽出カートリッジ、次いで、ODS 固相抽出カートリッジにてカプリル酸を除去した。このように処理した TTX 溶液を NMR で定量し、動物試験用試薬として国立医薬品食品衛生研究所に引き渡した。

次に、TTX 分析用標準品の調製と、TTX および TTX 類縁体の LC/MS/MS 分析法の開発を行った。分析用標準品としては、NMR 測定にも用いた試料から 0.1ml を正確に量りとり、1% 酢酸溶液で 100ml に定容したものをを用いた。これらは 2ml ガラスバイアルに 1ml ずつ分注し、分析用標準品を 100 本調製した。

東北大学から恵与いただいたコモンフグ卵巣抽出液の活性炭処理液を使い、TTX および TTX 類縁体検出のための LC/MS/MS 法を検討した。LC 装置には Nexera XR (Shimadzu)、MS 装置には QTRAP4500 (SCIEX) を用いた。分析カラムには、Waters 社製の Acquity UPLC BEH Amide カラム(2.1 × 150mm)を用いた。移動相は、麻痺性貝毒の高速分析法として報告されている Boundy *et al.*の方法を参考に調製した。カラム温度は 80 とし、分析試料の注入量は 4 μL とした。MRM のイオンチャンネルは次のとおりである。TTX, 4-*ep*TTX and 6-*ep*TTX: m/z 320.1/162.0 (51 eV), m/z 320.1/302.0 (33 eV) and m/z 320.1/60.0 (33 eV), 4,9-anhydroTTX: m/z 302.0/162.0 (51 eV) and m/z 302.0/256.0 (33 eV), 5,6,11-trideoxyTTX: m/z 272.0/254.0 (33

eV) and m/z 272.0/162.0 (51 eV), 5-deoxyTTX and 11-deoxyTTX: m/z 304.0/286.0 (33 eV), m/z 304.0/162.0 (51 eV) and m/z 304.0/176.0 (33 eV), 11-norTTX-6-ol: m/z 290.0/272.0 (33 eV) and m/z 290.0/162.0 (51 eV), 11-oxoTTX: m/z 336.1/162.1 (51 eV) and m/z 318.1/162.1 (51 eV), 6,11-dideoxyTTX: m/z 288.1/224.0 (33 eV), 5,11-dideoxyTTX: m/z 288.1/162.1 (51 eV)。Declustering potential は 106V とし、括弧内の数値は、コリジョンエネルギーを示す。

この条件を用いて、NMR 定量に用いた TTX 試薬内に類縁体が含まれているか調べた。また、4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX については、化学誘導した TTX 混合溶液を用いて検量線を作成し、TTX に対する相対モル感度を求めた。

C. 研究結果

1. TTX の定量 NMR 法の開発

TTX は溶液中で hemilactal 体と 10,7-lactone 体の化学平衡状態にある。また、TTX は酸性度を上げることで、4,9-anhydroTTX および 4-epiTTX に容易に変換する。そのため、溶液中では 4 成分の混合液として存在している。

市販の TTX 試薬を 4 種購入し、それぞれを重酢酸/重水溶媒 1 ml に溶解し、NMR スペクトルを測定した。その結果、TTX 酢酸塩 (2 種) では不純物の混入は認められなかった。一方、TTX クエン酸塩 (2 種) では、カウンターイオンとしてのクエン酸以外に、グリセロールの混入が認められた。このシグナルは、TTX の Lactone 体の H11 プロト

ンと一部重なっていたため、毒性評価には用いないこととした。また、TTX 由来シグナルを調べると、Hemilactal 体のシグナルが強く観測され、次いで 10,7-lactone 体、ごく微量ながら 4,9-anhydroTTX が観測された。なお、このときには、4-epiTTX 由来のシグナルを認めることはできなかった。これら成分を含んだ TTX 溶液について HSQC と HMBC 測定を行い、ピーク同定を行った。さらに、HSQC スペクトルから、ピーク同士の重なりなどを調べ、TTX 含量を測定するのによいシグナルを選別した。その結果、TTX の総量は、hemilactal 体と 10,7-lactone 体が重なった H-4a 位 (δ_{H} : 2.35 ppm) が適していると判断した。また、10,7-lactone 体の比率を求めるためには、H-8 位 (10,7-lactone, δ_{H} : 4.45 ppm) が適していた。なお、hemilactal 体の比率を求めるための分離したシグナルは見つけれなかったため、TTX 総量から 10,7-lactone 体の含量を差し引くことで求めることとした。4,9-anhydroTTX については、H-4a 位 (δ_{H} : 2.94 ppm) と H-8 位 (δ_{H} : 4.63 ppm) が適していると判断した。上記シグナルを使って、外標準法である PULCON にて定量し、各含量を求めた。その結果、ラベル表示値が 1 mg であったのに対し、NMR 定量で求めた含量は、780-880 μg 相当であった。このことから、ラベル値は過剰評価となっていることが判明した。また、各成分の比率は、hemilactal 体が 73-78%、10,7-lactone 体が 19-21%、4,9-anhydroTTX が 2-7%であった。

2. 4-EpiTTX の調製と混合溶液の定量 NMR 法の開発

TTX 溶液を測定しただけでは、4-epiTTX を認めることはできなかったため、化学誘導によって 4-epiTTX を調製し、4 種混合溶液を使い、再度 HSQC スペクトルを測定し、シグナル同士の重複がないか検討した。

重溶媒に溶解している TTX 試薬約 0.8 mg をグラファイトカーボン固相抽出カートリッジで処理し、過剰のクエン酸を除去した。溶媒を除去したのち、0.1mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 0.8 ml に溶解し、37 °C で 45 時間加熱した。その後、反応液を再度グラファイトカーボン固相抽出カートリッジで処理し、溶出液を凍結乾燥し、再び、1 ml の重溶媒に溶解した。その結果、4-epiTTX 由来のシグナルと思われる H-4 (δ_{H} : 5.14 ppm) が出現した。また、HSQC スペクトルから H-4a (δ_{H} : 2.85 ppm) を認めた。これらを 4-epiTTX を定量する際のシグナルに選抜した。また、これらシグナル以外に HSQC 上で 3 つのクロスピーク (4-epiTTX 由来) を新たに認め、それらが、定量に用いるシグナルと重複していないことを確認した。これにより再度 NMR スペクトルを見直すと、0.3-1.0% の 4-epiTTX が混在していることが判明した。

3. 動物試験用および分析用 TTX 溶液の調製

以上の結果から、TTX 酢酸塩が動物

試験用および分析用 TTX 標準液として適していると判断した。そこで、新たに、TTX 酢酸塩 (ラベル保証値: 25mg 相当) を購入して、NMR スペクトルを測定したところ、約 30% のカプリル酸が混入していることが分かった。そこで、TTX 溶液をグラファイトカーボン固相抽出カートリッジ、次いで ODS 固相抽出カートリッジで処理し、カプリル酸の除去を行った。その結果、以下の成分・含量を含む溶液 (9ml) を調製し、国立医薬品食品衛生研究所に引き渡した。

TTX 1.012 mg/ml
4,9-anhydroTTX 0.080 mg/ml
4-epiTTX 0.025 mg/ml
カプリル酸 0.005mg/ml

また、NMR 用に調製した TTX 溶液 (重溶媒) 0.1 ml を 1% 酢酸にて 100ml に定容した。よく混合したのち、1ml ずつ 2ml ガラスバイアルに分注した。これを LC/MS/MS 分析用 TTX 標準品とした。TTX 等の濃度は以下の通り。

TTX 1.012 $\mu\text{g/ml}$
4,9-anhydroTTX 0.080 $\mu\text{g/ml}$
4-epiTTX 0.025 $\mu\text{g/ml}$

調製後は -20 °C のフリーザーにて保管した。

4. フグ糖漬け内の TTX とその類縁体を検出するための LC/MS/MS 分析法の開発

調製した分析用 TTX 標準品を用い、LC/MS/MS のイオン源とイオンチャネルを最適化した。その結果、declustering potential は 106V であり、m/z 320/162 の時、コリジョンエネルギーは 51eV、m/z 320/302 の時、33eV であった。これを参考にして、MS3 で m/z162 を設定する成分については、コリジョンエネルギー 51eV を適用し、それ以外のチャネルを設定する場合には 33 eV を適用した。この条件で、コモング卵巣抽出液の活性炭処理物をアセトニトリルで 4 倍希釈したのち、分析に供したところ、12 成分 (4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4-epi-5,6,11-trideoxyTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, 5,11-trideoxyTTX, 6,11-trideoxyTTX, 5-trideoxyTTX, 11-trideoxyTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, 4,9-anhydroTTX, 4-epiTTX, TTX) を検出することに成功した。

この条件を用いて、購入した市販 TTX4 種を測定したところ、NMR で検出した 3 成分以外検出されなかった。

さらに、TTX 溶液を段階希釈したものを調製し、それらを分析して縦軸にピーク強度を、横軸にはラベル表示値と定量 NMR で求めた値とを用いた 2 種の検量線を作成して比較した。その結果、検量線の傾きは、ラベル表示値を用いたものが低かったことから、ラベル表示値は過大評価となっていることが裏付けられた。これにより、定量 NMR では適正に評価できることが判明した。

最後に、4-epiTTX を含む TTX 混合溶液を段階希釈して、それらを LC/MS/MS 法で分析した。各成分について検量線を作成し、TTX に対する 4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度 (RMR) を求めた。その結果、TTX の感度を 1 とすると、4epiTTX で 0.73、4,9-anhydroTTX で 0.46 であった。従って、次の式を使うことで、それら類縁体をより正確に概算できることが分かった。

$$C_{\text{tox}} = ([\text{PA}]_{\text{tox}} / [\text{PA}]_{\text{TTX}}) \times (C_{\text{TTX}} / \text{RMR})$$

C_{tox} : 類縁体の濃度、 $[\text{PA}]$: ピーク面積、 C_{TTX} : TTX の濃度、RMR: 相対モル感度

なお、これにより 4,9-anhydroTTX の TTX 総量に占める割合を求めると、定量 NMR で求めた値と比較的によく一致した。

5. TTX 溶液の安定性試験

TTX 酢酸塩を重溶媒に溶解した TTX 溶液を定期的に、外標準法である PULCON で定量した。解析ソフトウェアには Topspin 3.5 pl7 を用いた。外標準には、39.05mM のマレイン酸を用いた。なお、TTX 溶液は NMR チューブに入れ 4 で保管し、キャップからの溶媒揮発を抑えるため、テフロンシールとパラフィルムで保護した。

その結果、保管 44 週後で、TTX が若干増加しており、溶媒の揮発によるものと思われた。しかし TTX には変化無く一年近く分解しないことが確認できた。

D. 考察

TTX は溶液中で最大 4 成分の混合として存在している。NMR スペクトル上では、TTX hemilactal 体が最も多く存在していたが、液体クロマトグラフィーでは hemilactal 体と 10,7-lactone 体とを分離することはできない。そのため、NMR による定量を行う際には、hemilactal 体と 10,7-lactone 体との混合シグナルを与える H-4a 位を用いることとした。また、定量 NMR によって得られた TTX 含量とラベル保証値との間に齟齬が生じていることが判明した。これは正確な毒性評価を行ううえで重要な知見である。今回評価したいずれの市販 TTX もラベル保証値は過大評価となっており、いずれの試薬会社から購入しても同様の傾向があることが分かった。これらの知見に加えて、本年度は TTX 分析用標準品を作成した。これは国内では SI トレーサブルな手法を用いて値付けされた TTX の最初の例である。計 100 本を調製したので、複数の機関に配布することも可能となり、中毒事例の確認の際に有効に活用されるものと思われる。

今回、コモンフグ卵巣抽出液の活性炭処理物を使い、LC/MS/MS 法で TTX 各種類縁体が検出できることを確認した。このことから次年度実施するフグ糠漬け内の TTX および類縁体検索にも本法が有効に活用できると考えられる。また、4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度を求め、概算できるようにしたが、これにより、正確にフグ糠漬けの毒力を評価できるようになると思われる。

E. 結論

外標準法である PULCON 法を用いて TTX およびその類縁体を精確に定量できる手法を開発した。精確に値付けされた TTX 溶液を使い、分析用標準品および毒性評価用試薬を調製した。また、TTX の安定性を評価し、溶液状態で 1 年近く安定であることが判明した。フグ糠漬けに含まれる TTX 各種類縁体を検出できる LC/MS/MS 分析法を開発した。

F. 健康危険情報

研究分担者のため割愛

G. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichi Watanabe, Masato Tanioka, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Mari Yotsu-Yamashita, Toshiyuki Suzuki.
Quantitative ¹H-NMR Spectroscopy for Preparation of Certified Reference Material Tetrodotoxin, *J. Agri. Food Chem.*
Submitted.

2. 学会発表

○ 谷岡真里・渡邊龍一・内田肇・松嶋良次・及川寛・松宮政弘・鈴木敏之：テトロドトキシンの定量 NMR 法の開発と類縁体における相対モル感度の算出, 平成 30 年度日本水産学会秋季大会, 2018 年 9 月 16 日 (広島)

○ 渡邊龍一・谷岡真里・内田肇・
松嶋良次・及川寛・松宮政弘・鈴木
敏之：フグ毒テトロドトキシンの
定量 NMR , 定量 NMR クラブ第 7
回会合 , 2018 年 12 月 14 日 (東
京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

